

文章编号:1000-5641(2010)04-0092-11

# 灰树花多糖硫酸酯化衍生物的制备与抑制 HMEC 迁移的作用

毛逸嵘, 张易, 张红霞, 翁亮, 张红锋

(华东师范大学 生命科学学院, 上海 200062)

**摘要:** 灰树花(*Grifola frondosa*)高浓缩精粉经热水提取,95%乙醇沉淀,获得水溶性灰树花粗多糖 GFP. GFP 依次经 DEAE-cellulose 阴离子交换树脂及 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶分离纯化得到 GFP1-F, GFP1-M 及 GFP1-L 3 种不含蛋白质的葡聚糖纯品,其分子量依次为  $1.09 \times 10^5$ ,  $1.93 \times 10^4$  和  $2.76 \times 10^3$  Da. 采用吡啶-氯磺酸法对其进行硫酸酯化修饰,硫酸酯化衍生物 GFP1-FS, GFP1-MS 及 GFP1-LS 的红外光谱分析表明,3 个样品均在  $1\ 236.90\ \text{cm}^{-1}$  和  $811.81\ \text{cm}^{-1}$  有硫酸酯键的特征吸收峰, $^{13}\text{C}$  NMR 证明 C-6 上的羟基被酯化,并且 GFP1-FS 的硫酸酯化程度最高,其取代度 DS 为 1.07; GFP1-MS 与 GFP1-LS 的硫酸酯化程度相当,DS 分别为 0.66 和 0.61. 划痕法实验结果表明,经  $1\ 000\ \mu\text{g}/\text{mL}$  的 GFP1-FS, GFP1-MS 及 GFP1-LS 处理 24 h 后向划痕区迁移的细胞数明显减少,分别为对照组的 73.33%, 34.17% 和 67.21%, 均具有抑制人微血管内皮细胞(HMEC)迁移的活性,其中 GFP1-MS 的效果最为显著,这可能与 GFP1-MS 所具有的复杂分支结构有关.

**关键词:** 灰树花; 葡聚糖; 硫酸酯化衍生物; 人微血管内皮细胞; 迁移

**中图分类号:** Q28      **文献标识码:** A

## Preparation of *Grifola frondosa* polysaccharide sulfated derivatives and their inhibitory effects on HMEC migration

MAO Yi-rong, ZHANG Yi, ZHANG Hong-xia,

WENG Liang, ZHANG Hong-feng

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

**Abstract:** Polysaccharides from *Grifola frondosa* (GFP) were extracted by hot water and precipitated by 95% EtOH. GFP1-F, GFP1-M and GFP1-L were further purified by DEAE-cellulose and Sephadex G-100 subsequently from GFP. GFP1-F, GFP1-M and GFP1-L were glucan with molecular weight  $1.09 \times 10^5$ ,  $1.93 \times 10^4$  and  $2.76 \times 10^3$  Da. GFP1-FS, GFP1-MS and GFP1-LS were polysaccharide sulfates obtained from GFP1-F, GFP1-M and GFP1-L with chlorosulfonic acid-pyridine. The IR spectrum of GFP1-FS, GFP1-MS and GFP1-LS showed the characteristic absorptions of sulfate ester bond at  $1\ 230\ \text{cm}^{-1}$  and  $810\ \text{cm}^{-1}$ . The  $^{13}\text{C}$  NMR results indicated the

收稿日期:2009-04

第一作者:毛逸嵘,女,硕士研究生.

通讯作者:张红锋,女,副教授.研究方向为细胞生物学. E-mail: hfzhang@bio.ecnu.edu.cn.

modification mainly occurred at C-6 of the polysaccharide sulfates. GFP1-MS had the greatest sulfated degree with DS 1.07, while DSs of GFP1-FS and GFP1-LS were 0.66 and 0.61 respectively. The scratching assay suggested that 73.33%, 34.17% and 67.21% cells migrated to scratching area compared with control after 24-hour treatment of 1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  GFP1-FS, GFP1-MS and GFP1-LS respectively. So that all the three sulfated derivatives had inhibitory effects on HMEC migration, especially GFP1-MS had the strongest activity which may be related with its complicated branch structure.

**Key words:** *Gri fola frondosa*; glucan; sulfated derivative; HMEC; migration

## 0 引 言

在肿瘤生长、侵袭和转移的一系列过程中,血管的形成可以为肿瘤组织提供营养物质和氧气,还为肿瘤细胞的血行转移提供通路<sup>[1]</sup>,因此抑制肿瘤血管的形成对于抗肿瘤具有重要意义.肿瘤血管的形成是血管内皮细胞、基底膜成分和肿瘤细胞等多种成分相互作用的结果,肿瘤细胞通过释放血管内皮生长因子(VEGF)激活内皮细胞,同时产生蛋白酶降解基底膜,促使内皮细胞增殖、迁移.目前多数学者认为肿瘤血管内皮是由周围正常组织的血管内皮增生、迁移和分化形成的<sup>[2]</sup>,它是邻近肿瘤细胞的组织中的正常内皮细胞,遭受肿瘤微环境的刺激,持续不断的增生,发生形态和功能的变化而形成肿瘤血管内皮.因此血管内皮细胞成为抗肿瘤药物研究的靶点之一.本文将从灰树花(*Gri fola frondosa*)多糖的硫酸酯化衍生物对人微血管内皮细胞(HMEC)迁移能力的影响,来研究其抗肿瘤活性.

已有研究表明,一些多糖,如昆布多糖<sup>[3]</sup>及岩藻衣多糖<sup>[4]</sup>具有抑制血管生成的作用. Kojoanagi S 等<sup>[4]</sup>实验结果显示,天然的岩藻衣多糖和过硫酸酯化岩藻衣多糖都能阻断 VEGF<sub>165</sub> 与人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的结合,从而抑制 HUVEC 的生长、迁移、成管和新生血管的生成,其中硫酸酯化岩藻衣多糖的抑制作用更加明显.目前研究发现,经硫酸酯化修饰的灰树花多糖具有显著的抗病毒、抗炎症、抗肿瘤及抗凝血的活性<sup>[5-8]</sup>.灰树花多糖硫酸酯化衍生物的抗肿瘤作用主要表现在增强免疫功能进而间接杀灭肿瘤细胞,或直接抑制肿瘤细胞生长两个方面<sup>[6,9]</sup>.史宝军等<sup>[10]</sup>实验结果表明,灰树花多糖硫酸酯化衍生物 S-GAP-P 能抑制肿瘤细胞 SGC-7901 的增殖,并促使细胞凋亡.关于灰树花多糖硫酸酯化衍生物对血管内皮细胞迁移能力的影响尚未见报道.本文从灰树花高浓缩精粉水提取物中获得不含蛋白且主要含有  $\alpha$  糖苷键的 3 个葡聚糖组分,并对其进行硫酸酯化修饰,利用划痕法(Scratching assay)初步探讨灰树花多糖硫酸酯化衍生物对血管内皮细胞迁移的作用.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

灰树花高浓缩精粉由上海童童食品有限公司提供;Cellulose DE-52 为 Whatman 产品;Sephadex G-100 为上海喜润化学工业有限公司产品;T 系列 Dextran 标准葡聚糖为 Pharmacia 产品;氯磺酸、吡啶、甲酰胺、三氟乙酸(TFA)、硼氢化钠和乙酸酐等试剂均为国产分析纯.

人微血管内皮细胞(HMEC)购自美国 ATCC 公司,用含 20% 胎牛血清的 Mcdb131 培养基进行传代培养.

紫外-可见分光光度计 UV-VIS 8500 spectrophotometer(上海天美科学仪器有限公司); HPLC 色谱仪 1100 化学工作站 (Beckman Corporation), 色谱柱为 TSK-GEL G4000PW<sub>(XL)</sub>(TOSOH); 气质联用分析仪 Thermo FINNIGAN(Thermo Electron Corporation), 气相色谱柱为 Rtx-5MS(15 m×0.25 mm×0.25 μm); 红外光谱分析仪 NICOLET NEXUS 670FT-IR(Thermo Electron Corporation); 核磁共振波谱分析仪 Bruker DRX 500 (Bruker Corporation).

### 1.2 灰树花多糖的分离与纯化

灰树花多糖的分离纯化流程如图 1 所示. 灰树花高浓缩精粉 100 g 溶于 1 L 开水中, 趁热过滤, 加入 3 倍体积的 95% 乙醇, 4 °C 静置 24 h, 倾去上清液, 沉淀依次用两倍体积的无水乙醇和丙酮洗涤以脱去水分, 40 °C 下烘干得灰树花粗多糖 GFP 39.829 g, 得率为 39.8%. 取一定量 GFP 溶于 10 倍体积的水中, 离心除去不溶物后, 上 DEAE-cellulose 阴离子交换柱. 糖类化合物分子中含有许多醇羟基而具有弱酸性和极性, 可与强碱性阴离子交换树脂发生离子交换作用而被吸附. 中性多糖不与吸附剂交换而自然流出, 酸性多糖含有羧基, 吸附在纤维素离子交换树脂上, 可用 NaCl 梯度溶液作为洗脱剂将酸性多糖从树脂上洗脱下来, 达到酸性多糖与中性多糖分离提纯的目的. 因此依次用水、0.1, 0.2, 0.4 和 0.8 mol/L NaCl 溶液洗脱, 苯酚-浓硫酸法检测各管糖含量, 合并各流分. 减压浓缩后对蒸馏水透析(透析袋型号 MD45(2000)), 内液冷冻干燥, 得到水洗组分 GFP1, 为中性多糖, 以及 0.1 mol/L NaCl 洗脱组分 GFP2 为酸性多糖, 0.2~0.8 mol/L NaCl 洗脱时未得到其它组分(见图 2). GFP1 溶于 0.1 g/L 叠氮化钠溶液中, 上 Sephadex G-100 柱(2.6 cm×70 cm), 经 0.1 g/L 叠氮化钠溶液洗脱, 依次得到 GFP1-F, GFP1-M 和 GFP1-L 3 个多糖组分.

### 1.3 多糖纯度及分子量的测定

将 GFP1-F, GFP1-M 和 GFP1-L 配成 1 mg/mL 水溶液, 400~200 nm 紫外扫描, 观察在 280 nm 处是否有紫外吸收, 检测蛋白含量.

采用高效凝胶渗透色谱法 (HPGPC) 测定多糖分子量. HPLC 色谱仪由 Beckman Coulter System Gold 508 自动进样器, Gold 126 gradient HPLC 泵及 Sedex 75 ELSD 检测器构成. 色谱柱为 TSK-GEL G4000PW<sub>(XL)</sub>, 流动相为 0.003 mol/L NH<sub>4</sub>AC, 流速 0.5 mL/min, 样品浓度为 0.2% (w/v), 进样量 10 μL. 用 T 系列 Dextran(T500, T70, T40 和 T10, Pharmacia) 制作标准曲线, 标准曲线方程为  $\lg M = -0.4136x + 12.25$ , 根据分子量与保留时间 RT 的关系, 即可算出多糖的平均分子量.

### 1.4 糖基组成分析

取 GFP1-F, GFP1-M 和 GFP1-L 各 2 mg, 溶于 4 mL 2 mol/L TFA 中, 110 °C 下封管水解 1.8 h, 加甲醇反复减压浓缩至干. 产物溶于 2 mL H<sub>2</sub>O 中, 取 5 μL 进行 TLC 分析确定是否含有糖醛酸(如含糖醛酸会显示粉红色斑点). 剩余部分加入 25 mg NaBH<sub>4</sub>, 室温下还原 2 h, 间歇振荡, 用乙酸中和至无气泡产生, 反复加甲醇减压蒸发至完全干燥. 于 100 °C 下干燥 15 min, 加入 2 mL 乙酸酐, 100 °C 反应 1 h. 反复加甲苯减压蒸发除去乙酸酐, 产物经氯仿萃取, 水洗 4 次, 氯仿层经无水硫酸钠干燥, 浓缩至 50 μL 后进行 GC-MS 分析<sup>[11]</sup>.

气相分析仪为 FINNIGAN Trace GC Ultra, 质谱分析仪为 FINNIGAN Trace DSQ. 气相色谱柱为 DB-5MS 毛细管柱(15 m×0.25 mm×0.25 μm), 进样量 1 μL, 流速 1 mL/min. 温度设定从 120 °C 到 250 °C, 10 °C/min, 在到达 250 °C 后保持 10 min.

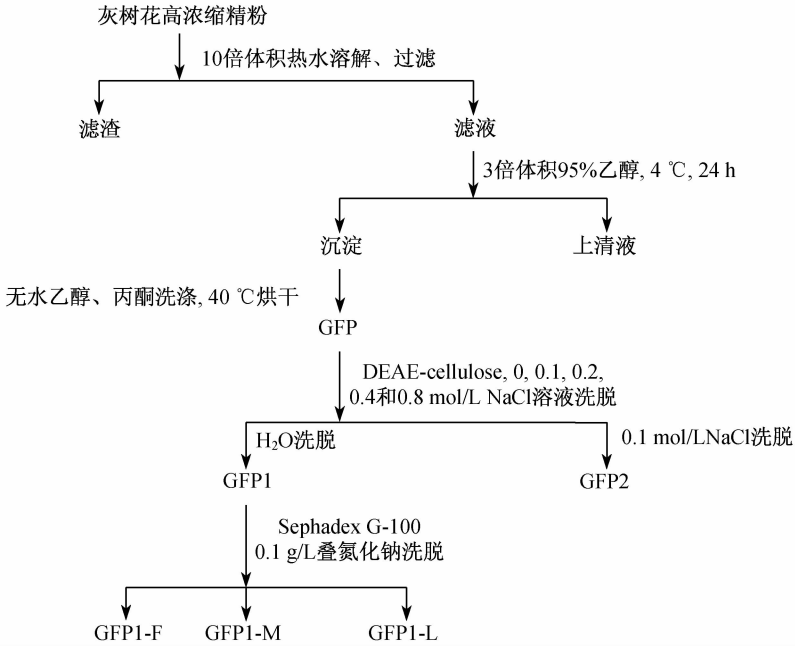


图 1 灰树花多糖分离纯化流程图

Fig. 1 Scheme for isolation and purification of GFP1-F, GFP1-M and GFP1-L

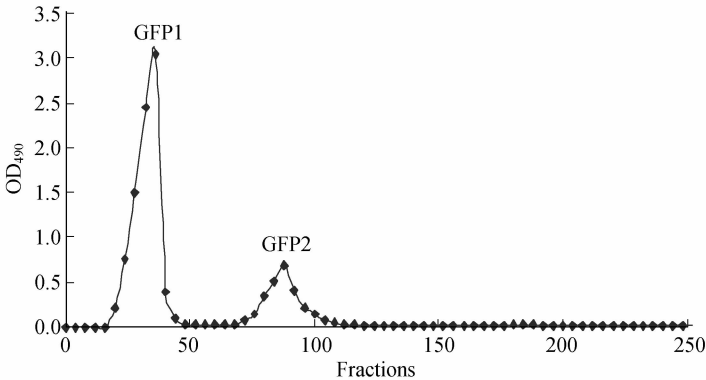


图 2 GFP 在 DEAE-cellulose 上的洗脱图

Fig. 2 Elution profile of GFP on DEAE-cellulose column

### 1.5 硫酸酯化修饰

采用吡啶-氯磺酸法对 GFP1-F, GFP1-M 及 GFP1-L 进行硫酸酯化修饰<sup>[11]</sup>, 各取 50 mg 加入 5 mL 甲酰胺, 室温下磁力搅拌 15 min, 加入 1.33 mL 吡啶, 然后逐滴加入 0.67 mL 氯磺酸, 室温下搅拌 2 h. 反应液于 40 °C 下保温 4 h, 之后加入 10 mL 甲醇, 最后用 2.5 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0. 反应液对水透析, 经浓缩、冻干后即得相应的硫酸酯化衍生物, 分别命名为 GFP1-FS, GFP1-MS 和 GFP1-LS.

### 1.6 硫酸基含量测定及取代度(DS)计算

硫酸基含量测定采用氯化钡-明胶浊度法<sup>[12]</sup>. 精确量取 0, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16 和

0.2 mL 标准硫酸钠溶液于具塞试管中,补加 1 mol/L HCl 至体积为 0.2 mL,分别加入 3.8 mL 3% 三氯乙酸( $w/v$ )和 1 mL 氯化钡-明胶试剂,混匀后于室温下静置 15 min,以不含标准液的 0 号管作为空白管,测定 360 nm 下的吸光度.以含硫的质量为横坐标,吸光度为纵坐标,得标准曲线.

称取各硫酸酯化衍生物 4.5 mg 于具塞试管中,加入 1 mol/L HCl 4.5 mL,100 °C 下水解 2.5 h,冷却至室温后取 0.2 mL 进行测定,后续操作同标准曲线测定过程.根据标准曲线计算出硫的含量  $S\%$ .

样品取代度的计算公式为: $DS = 1.62 \times S\% / (32 - 1.02 \times S\%)$ ;  $S\%$  为 S 含量.

## 1.7 红外光谱分析

取 1 mg 样品,溴化钾压片,于 4 000~500  $\text{cm}^{-1}$  进行红外扫描.

## 1.8 核磁共振分析

取 GFP1-F, GFP1-M, GFP1-L, GFP1-FS, GFP1-MS 和 GFP1-LS 各 40 mg,溶于 0.5 mL  $\text{D}_2\text{O}$  中,置于  $\Phi 5$  mm 核磁管中,TMS 作内标,500 MHz 核磁仪于室温下测定.

## 1.9 血管内皮细胞运动能力实验(划痕法)

利用划痕法研究血管内皮细胞的迁移运动<sup>[13]</sup>. HMEC 细胞以  $8 \times 10^5$ /孔接种至 6 孔板中,细胞在 37 °C 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中常规培养 1 d,至细胞长满 90%. 换成含 1% 胎牛血清的培养基进行同步化处理 12 h. 然后,用 1 mL 的灭菌枪头进行十字划痕,划痕后用 D-Hank's 液润洗两次,洗去浮起的细胞.每孔加入 1 mL 含 1% 胎牛血清的培养基,实验组分别加入灰树花多糖及其硫酸酯化衍生物(用含 1% 血清的培养基配制),终浓度为 1 mg/mL. 将培养板放入  $\text{CO}_2$  培养箱,37 °C 5%  $\text{CO}_2$  常规培养 24 h.

划痕后即刻在倒置相差显微镜下拍照,标记划痕宽度.培养 24 h 后再次拍照,人工计数迁移至划痕区的细胞数.以空白对照组表示为 100%,各实验组与对照组相比得出迁移细胞数的相对百分率.

# 2 结果与讨论

## 2.1 多糖的分离纯化与结构初探

### 2.1.1 多糖的分离与纯化

经过沸水提取,95% 乙醇沉淀,DEAE Cellulose 阴离子交换色谱分离,得到水洗组分 GFP1. 再经 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶色谱纯化,依次获得 3 个组分——GFP1-F, GFP1-M 和 GFP1-L. 用碘-碘化钾试剂检测均不显蓝色,表明其不为淀粉.

HPGPC 结果显示,GFP1-F, GFP1-M 和 GFP1-L 均表现为对称的单峰(见图 3),说明三者都为均一组分. 根据标准曲线方程和样品的保留时间,计算平均分子量,GFP1-F, GFP1-M 和 GFP1-L 的分子量依次为  $1.09 \times 10^5$ ,  $1.93 \times 10^4$  和  $2.76 \times 10^3$  Da (见表 1).

紫外扫描的结果显示,GFP1-F, GFP1-M 和 GFP1-L 在 280 nm 处均无紫外吸收,说明所得到的 3 个多糖组分都不含有蛋白质.

### 2.1.2 糖组成分析

GFP1-F, GFP1-M 和 GFP1-L 3 个样品经 TFC 完全水解后,TLC 分析未看到粉红色斑点,表明均不含有糖醛酸,为中性多糖. GC-MS 分析结果表明,3 个样品的谱图均显示一个单峰,与标准品葡萄糖的谱图对比,3 个样品均完全由葡萄糖组成,即为葡聚糖(见图 4).

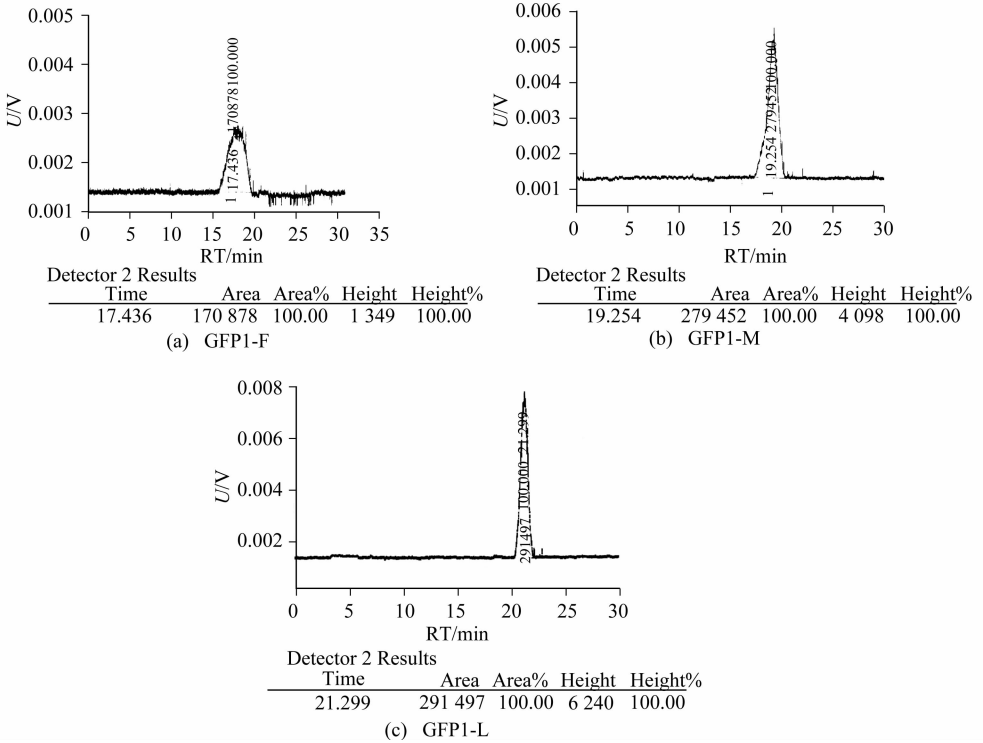


图 3 GFP1-F,GFP1-M和 GFP1-L 的 HPGPC 图谱

Fig. 3 HPGPC profile of GFP1-F, GFP1-M and GFP1-L

表 1 GFP1-F,GFP1-M和 GFP1-L 在 HPGPC 检测中的保留时间及相应的分子量

Tab. 1 The retaining time and molecular weight of GFP1-F, GFP1-M &amp; GFP1-L in HPGPC

样品	保留时间(RT)/min	分子量/Da
GFP1-F	17.436	$1.09 \times 10^5$
GFP1-M	19.254	$1.93 \times 10^4$
GFP1-L	21.299	$2.76 \times 10^3$

### 2.1.3 GFP1-F,GFP1-M和 GFP1-L 结构分析

红外光谱显示 GFP1-F 在  $847.59 \text{ cm}^{-1}$  处有吸收峰, $^1\text{H}$  NMR 谱显示 GFP1-F 的 H1 信号在  $\delta 5.407 \text{ ppm}$ ,表明 GFP1-F 为  $\alpha$  葡聚糖。 $^{13}\text{C}$  NMR 结果显示,C-1 信号在  $\delta 99.702 \text{ ppm}$ ,表明为  $\alpha$ -1,4-糖苷键。在  $\delta 60.370 \text{ ppm}$  有一个较强的 C-6 信号,在  $\delta 69.224 \text{ ppm}$  有一个较弱的 C-6 信号,说明有极少量的 C-6 取代。C-4,C-3,C-5 及 C-2 信号分别在  $\delta 76.658 \text{ ppm}$ ,  $\delta 72.788 \text{ ppm}$ ,  $\delta 71.442 \text{ ppm}$  及  $\delta 70.288 \text{ ppm}$ (见图 5a)。由此初步判断 GFP1-F 具有  $\alpha$ -1,4-糖苷键的主链和极少量  $\alpha$ -1,6-糖苷键的分支。

$^1\text{H}$  NMR 结果显示 GFP1-M 的 H1 信号有 3 个,分别在  $\delta 5.343 \text{ ppm}$ ,  $\delta 5.059 \text{ ppm}$  和  $\delta 4.917 \text{ ppm}$ 。前两个信号均大于  $5 \text{ ppm}$ ,属于  $\alpha$  构型的特征,而第 3 个信号小于  $5 \text{ ppm}$ ,属于  $\beta$  构型的特征<sup>[11]</sup>,因此,GFP1-M 的结构中  $\alpha$  和  $\beta$  两种构型同时存在。GFP1-M 的  $^{13}\text{C}$  NMR 结果显示,C-1 信号共有 4 个,依次在  $\delta 98.953 \text{ ppm}$ ,  $\delta 99.173 \text{ ppm}$ ,  $\delta 100.895 \text{ ppm}$  和

$\delta 103.546$  ppm, 前 3 个信号属于  $\alpha$  构型, 为  $\alpha$ -1,4-糖苷键; 而第 4 个信号与  $\beta$ -1,4-葡聚糖的 C-1 信号相吻合<sup>[11]</sup>, 进一步表明 GFP1-M 含有  $\alpha$  和  $\beta$  两种构型的糖苷键. C-6 信号出现在  $\delta 62.019$  ppm 和  $\delta 68.085$  ppm, 说明 C-6 位有取代. C-4, C-3, C-5 和 C-2 信号分别在  $\delta 78.117$  ppm,  $\delta 74.359$  ppm,  $\delta 72.659$  ppm 和  $\delta 71.439$  ppm (见图 5b). 由此初步判断 GFP1-M 具有  $\alpha$ -1,4-糖苷键的主链和少量  $\alpha$ -1,6-糖苷键的分支以及  $\beta$ -1,4-糖苷键的分支.

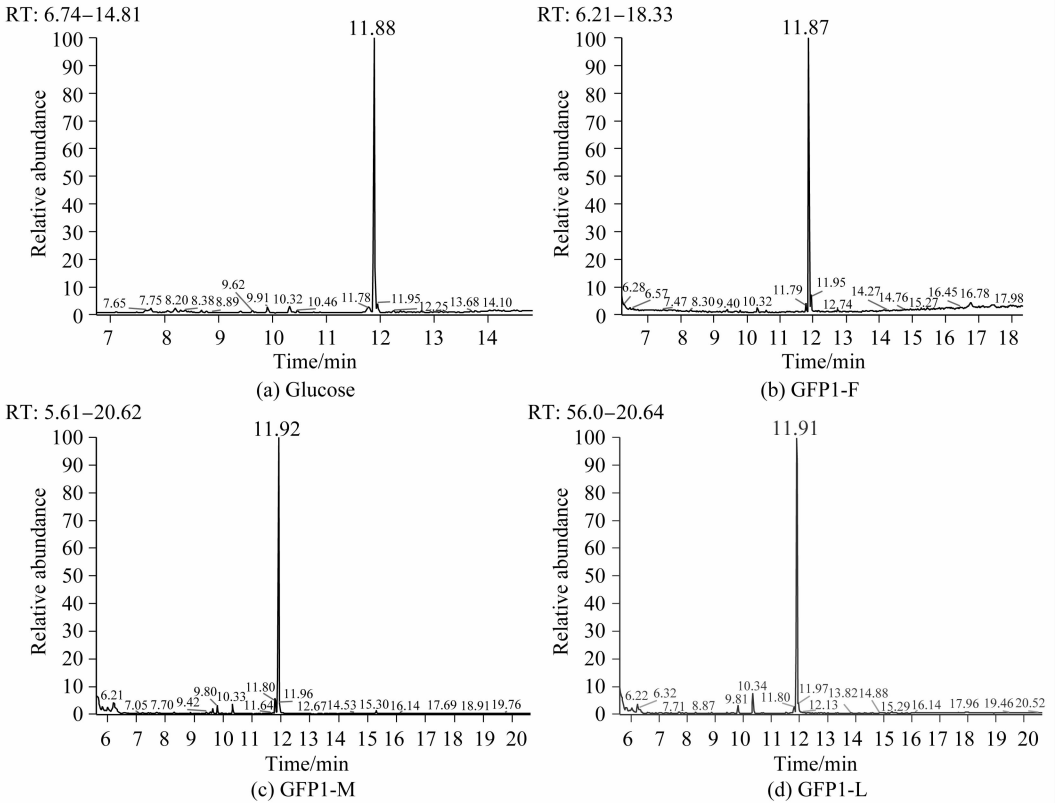


图 4 标准葡萄糖, GFP1-F, GFP1-M 和 GFP1-L 的糖组成分析 GC 图

Fig. 4 GC pattern of sugar composition analysis of GFP1-F, GFP1-M & GFP1-L

红外光谱分析结果显示, GFP1-L 在  $848.34 \text{ cm}^{-1}$  处有吸收峰,  $^1\text{H}$  NMR 谱结果显示 GFP1-L 的 H1 信号在  $\delta 5.332$  ppm, 表明 GFP1-L 为  $\alpha$  葡聚糖. GFP1-L 的  $^{13}\text{C}$  NMR 结果显示 C-1 信号在  $\delta 101.252$  ppm, C-6 信号在  $\delta 61.688$  ppm, C-4, C-3, C-5 和 C-2 信号分别在  $\delta 79.067$  ppm,  $\delta 75.252$  ppm,  $\delta 73.958$  ppm 和  $\delta 71.195$  ppm (见图 5c), 表明 GFP1-F 为  $\alpha$ -1,4-连接的葡聚糖, 但用碘-碘化钾检测无显色反应, 说明不是直链的 1,4 葡聚糖, 可能存在支链结构. Shi Lei<sup>[14]</sup> 等分离到一种带有 1,6 分支结构的  $\alpha$ -1,4-葡聚糖, 其  $^{13}\text{C}$  NMR 谱图与 GFP1-L 的非常相似, 虽然这种葡聚糖中含有 1,6 糖苷键, 但并未出现 C6 位上发生取代的信号, 这可能与 1,6 糖苷键在整条糖链中所占的比例有关, 根据文献<sup>[12]</sup> 一般认为取代基含量少于 5%, 还是不能出现信号的. 据此推测, GFP1-L 可能是含有极少量 1,6 连接分支结构的  $\alpha$ -1,4 葡聚糖.

## 2.2 硫酸酯化衍生物制备

### 2.2.1 硫酸酯化程度分析

GFP1-F, GFP1-M 和 GFP1-L 经硫酸酯化后的含硫量及 *DS* 如表 2 所示. 3 个样品中, GFP1-FS 的硫酸酯化程度最高, *DS* 为 1.07; 而 GFP1-MS 与 GFP1-LS 的硫酸酯化程度相当, *DS* 分别为 0.66 和 0.61.

表 2 GFP1-FS, GFP1-MS 和 GFP1-LS 的硫酸酯化程度

Tab. 2 Degrees of substitution (*DS*) of GFP1-FS, GFP1-MS & GFP1-LS

Derivatives	Sulfate contents/%	<i>DS</i>
GFP1-FS	12.60	1.07
GFP1-MS	9.23	0.66
GFP1-LS	8.76	0.61

### 2.2.2 硫酸酯化衍生物的红外光谱分析

比较硫酸酯化前后的红外光谱可以看出, 3 种硫酸酯化产物的红外光谱均在  $1\ 236.90\ \text{cm}^{-1}$  显示出不对称的 S=O 键振动吸收峰, 在  $811.81\ \text{cm}^{-1}$  显示出对称的 C-O-S 伸缩振动吸收峰, 这些都是硫酸酯键的特征吸收峰. 同时, 还可以看出在  $3\ 400\ \text{cm}^{-1}$  附近的羟基吸收峰有所降低, 表明部分羟基已被酯化, 证明 GFP1-F, GFP1-M 和 GFP1-L 已修饰形成硫酸酯化衍生物 GFP1-FS, GFP1-MS 和 GFP1-LS.

### 2.2.3 硫酸酯化衍生物的 $^{13}\text{C}$ NMR 分析

对比 GFP1-F, GFP1-M 和 GFP1-L 硫酸酯化前后的 $^{13}\text{C}$  NMR 谱图, 3 个样品经过硫酸酯化修饰后 C-6 信号均由修饰前的  $\delta 61\ \text{ppm}$  左右移至  $\delta 66\ \text{ppm}$  左右的位置, 且硫酸酯化前在  $\delta 61\ \text{ppm}$  的信号均完全消失(见图 5), 表明 GFP1-F, GFP1-M 和 GFP1-L 上原先未发生取代的 C-6 上几乎都与硫酸基成酯.

另外, GFP1-FS 与 GFP1-LS 的 $^{13}\text{C}$  NMR 谱图显示, 这两个样品的 C-1 信号均向高场位移大约  $4\ \text{ppm}$ , 提示 C-2 上可能发生硫酸基的取代, 由此对  $\beta$  碳增进屏蔽, 使其信号向高场方向移动<sup>[15]</sup>. 同时在 $^1\text{H}$  NMR 谱图上看到 H1 信号向低场位移大约  $0.5\ \text{ppm}$ , 还在 $^{13}\text{C}$  NMR 谱图上看到 GFP1-FS 与 GFP1-LS 的 C-3 信号为两个小峰, 即向低场方向裂解出一个峰. 这些都可能是受 C-2 上硫酸基取代的影响而出现的. 但是 C-2 位上羟基的硫酸酯化修饰的相当微弱的.

从硫酸酯化产物的 $^{13}\text{C}$  NMR 结果可以看出,  $\alpha$ -1, 4 葡聚糖的硫酸酯化反应中 C-6 位上羟基的反应活性远大于 C2 位置上的羟基, 甚至 C-6 位上羟基的可以全部被硫酸酯化修饰, 这与前人的研究结果一致<sup>[16]</sup>.

## 2.3 硫酸酯化衍生物对 HMEC 细胞迁移能力的影响

划痕法是一种模拟体外愈伤模型设计的考察细胞迁移运动能力的实验, 可从二维水平上衡量药物对细胞迁移能力的影响<sup>[12]</sup>. 本文分别用  $1\ 000\ \mu\text{g}/\text{mL}$  的 GFP1-F, GFP1-M 及 GFP1-L 作用 HMEC 细胞 24 h, 发现各组细胞均向划痕区爬行, 组间没有显著差异(照片未列在本文中), 说明 3 个多糖组分没有抑制 HMEC 迁移的作用.

分别用  $1\ 000\ \mu\text{g}/\text{mL}$  的 GFP1-FS, GFP1-MS 和 GFP1-LS 作用 HMEC 细胞 24 h, 镜检记录 HMEC 向划痕区迁移的细胞数. 由图 6 可以看出, Control 组的划痕区基本上已经被爬出的 HMEC 细胞所占据. 与此相比, 经 GFP1-FS, GFP1-MS 和 GFP1-LS 处理后向划痕区



迁移的细胞数明显减少,分别为对照组的 73.33%,34.17%和 67.21%,其中 GFP1-MS 对 HMEC 细胞迁移的抑制效果最为显著( $P < 0.01$ ),比 GFP1-FS 与 GFP1-LS 的抑制效果强一倍,而且细胞爬出的距离也相对最短。

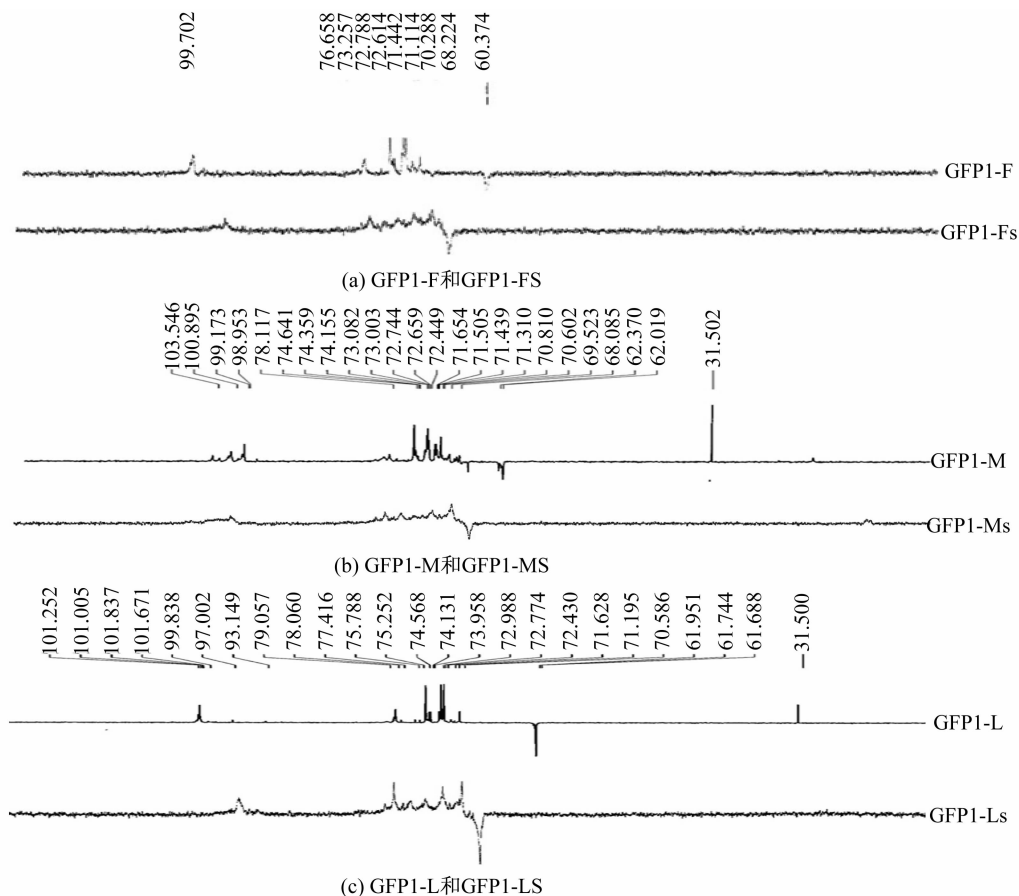


图 5 GFP1-F, GFP1-M, GFP1-L 及其硫酸酯化衍生物的  $^{13}\text{C}$  NMR 谱图

Fig. 5  $^{13}\text{C}$  NMR spectrums of GFP1-F, GFP1-M, GFP1-L and their sulfated derivatives

实验结果表明,3 个灰树花多糖样品对 HMEC 细胞迁移没有影响,而其硫酸酯化衍生物具有明显的抑制细胞迁移的作用。Cheng JJ<sup>[17]</sup>等利用划痕实验发现 1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的樟芝多糖能抑制牛主动脉内皮细胞(BAEC)的迁移运动。Kojoanagi S 等<sup>[4]</sup>在 Transwell 小室实验中发现,天然的岩藻衣多糖和过硫酸酯化岩藻衣多糖均能抑制 HUVEC 的迁移,100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 岩藻衣多糖处理后迁移细胞数是对照组的 75.2%,100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 过硫酸酯化岩藻衣多糖处理后迁移细胞数是对照组的 56.1%。天然的岩藻衣多糖本身具有一定的硫酸基团,其含硫量为 32.6%,由此表现出抑制细胞迁移的活性,而过硫酸酯化岩藻衣多糖的含硫量为 56.7%,其抑制作用则更为明显。本文制备的灰树花多糖硫酸酯化衍生物 GFP1-FS, GFP1-MS 和 GFP1-LS 的含硫量分别为 12.6%, 9.23% 和 8.76%,以 GFP1-MS 的抑制效果最为显著,由于 GFP1-MS 是三者中分支结构最复杂的,所以结果提示,灰树花多糖硫酸酯化衍生物对细胞迁移的抑制作用不仅与硫酸酯化修饰有关,还可能与 GFP1-MS 所具有的复杂分支结构有关。

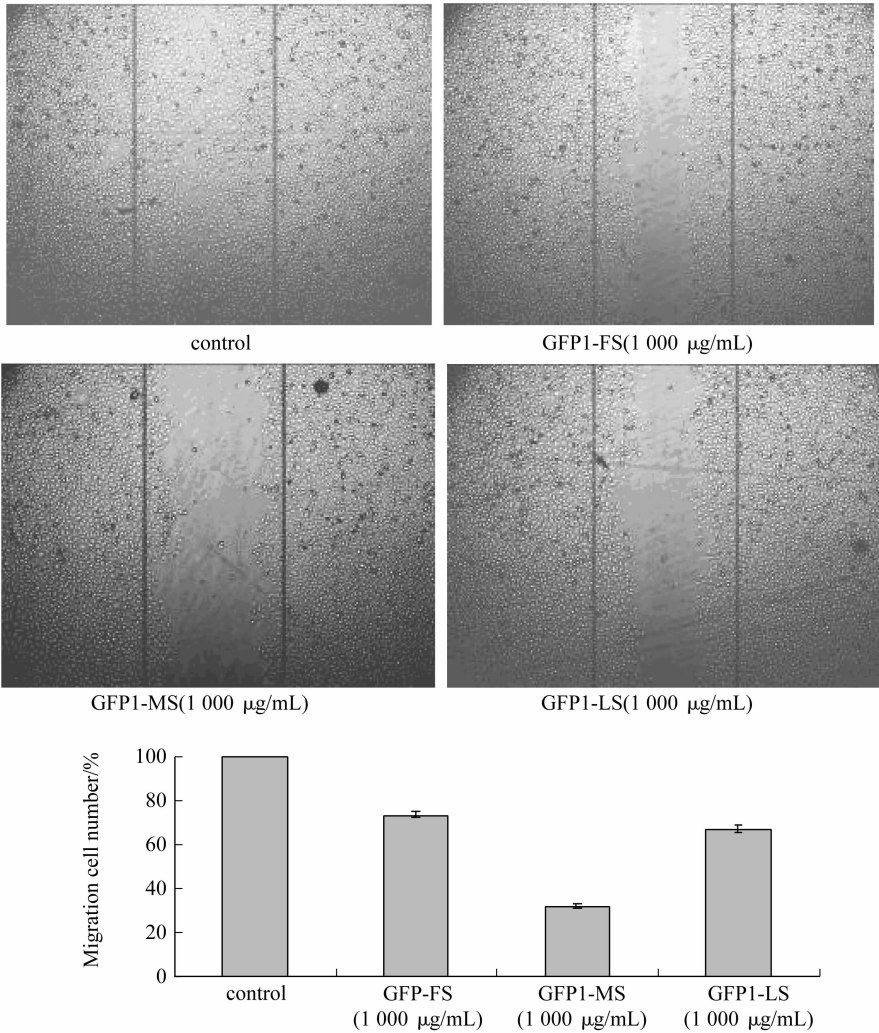


图 6 灰树花多糖硫酸酯化衍生物作用 24 h 对 HMEC 细胞迁移能力的影响

Fig. 6 The effect of sulfated derivatives on HMEC migration after 24 h treatment

注: 各组照片中两条纵线表示划痕宽度;与 control 相比,GFP1-MS 有极显著差异 ( $P < 0.01$ ),GFP1-FS 和 GFP1-LS 有显著差异 ( $P < 0.05$ )

### [参 考 文 献]

- [1] FOLKMAN J, BROWDER T, PALMBLAD J. Angiogenesis research: guidelines for translation to clinical application[J]. Thromb Haemost, 2001, 86: 23-33.
- [2] PAN H. Tumor angiogenesis and clinical application of antiangiogenesis[J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2006, 37: 133-136.
- [3] 徐中平, 李富川, 王海仁. 昆布多糖硫酸酯的抑制血管生成和抗肿瘤作用[J]. 中草药, 1999(7):24-26.  
XU Z P, LI F C, WANG H R. Anti-angiogenic and anti-tumor activities of sulfated fucoidan[J]. Chinese Medicine, 1999(7): 24-26.
- [4] KOJOANAGI S, TANIGAWA N, NAKAGAWA H, et al. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities [J]. Biochemical pharmacology, 2003, 65: 173-179.

- [5] 栗衍华, 谭成玉, 王秀武, 等. 硫酸酯化多糖的制备及其生物活性的研究进展[J]. 精细与专用化学品, 2006, 14: 6-9.  
LI Y H, TAN C Y, WANG X W, et al. Progresses on preparation of sulfated polysaccharides and its bioactivity [J]. Fine and Specialty Chemicals, 2006, 14: 6-9.
- [6] 刘安, 臧立华, 孙庆济. 灰树花多糖抗肿瘤作用临床观察[J]. 山东轻工业学院学报, 2008, 22(2): 43-45.  
LIU A, ZANG L H, SUN Q J. Clinical observation of effect on *Grifola frondosa* amylose against tumor[J]. Journal of Shandong Institute of Light Industry, 2008, 22(2): 43-45
- [7] NIE X H, LIU Y L, TAO W Y, et al. Preparation of a chemically sulfated polysaccharide derived from *Grifola frondosa* and its potential biological activities[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2006, 39: 228-233.
- [8] 于广利, 高昊东, 杨波, 等. 一种水不溶灰树花菌丝体多糖(GF4A)硫酸酯化研究 [J]. 中国海洋大学学报, 2008, 38(1): 17-22.  
YU G L, GAO H D, YANG B, et al. Study on sulfate condition of a water-insoluble mycelia polysaccharide from *Grifola frondosa* (GF4A)[J]. Journal of Chinese Ocean University, 2008, 38(1): 17-22.
- [9] 郁皓, 许泓瑜, 华东. 硫酸酯化灰树花多糖体外诱导胃癌细胞 SGC-7901 凋亡的研究[J]. 山东医药, 2006, 46(21): 54-55.  
YU H, XU H Y, HUA D. Study on apoptosis induction of sulfated derivatives of *Grifola frondosa* polysaccharide on SGC-7901 *in vitro* [J]. Shandong Medicine, 2006, 46(21): 54-55.
- [10] SHI B J, NIE X H, CHEN L Z, et al. Anticancer activities of a chemically sulfated polysaccharide obtained from *Grifola frondosa* and its combination with 5-Fluorouracil against human gastric carcinoma cells[J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 68: 687-692.
- [11] BLACKENEY A B, HARRIS P J, HENRY R J, et al. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis [J]. Carbohydrate Res, 1983, 113: 291-299.
- [12] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1997.  
ZHANG W J. Biochemical Research Techniques of Sugar Complex [M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 1997.
- [13] AZNAVOORIAN S, KUBO K, AOK H N, et al. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis[J]. Cancer, 1993, 71: 1368-1370.
- [14] SHI L, ZHANG L N, DING K. A novel water-soluble  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glucan from the root of *Cudrania tricuspidata* [J]. Fitorapia, 2007, 78: 298-301.
- [15] 葛青, 张安强, 孙培龙. 真菌多糖结构修饰及鉴定研究进展[J]. 中国食用菌, 2008, 27(1): 5-8.  
GE Q, ZHANG A Q, SUN P L. Research progress in structural modifications of polysaccharide in fungi and their identification[J]. Edible Fungi of China, 2008, 27(1): 5-8.
- [16] 王顺春, 方积年. 香菇多糖硫酸酯化衍生物的制备及其结构分析[J]. 生物化学与生物物理学报, 1999, 31(5): 594-597.  
WANG S C, FANG J N. Preparation and structural analysis of sulfated derivatives of Lentinan[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 1999, 31(5): 594-597.
- [17] CHENG J J, HUANG N K, CHANG T T, et al. Study for anti-angiogenic activities of polysaccharides isolated from *Antrodia cinnamomea* in endothelial cells[J]. Life Science, 2005, 76: 3029-3042.